R. Hürlimann und P. S. Chen. — Ontogenetische Veränderungen des Enzymmusters in der Hämolymphe von *Phormia regina*. (Mit 3 Textabbildungen).[1]

Zoologisch-vergl. anatomisches Institut der Universität Zürich.

Im Verlauf der Ontogenese von Insekten finden tiefgreifende Veränderungen im Muster und in der Synthese der Hämolympheproteine statt. Im Gegensatz zum Wirbeltierblut steht die Insektenhämolymphe in direktem Kontakt mit den Geweben. Eine Analyse ihrer Zusammensetzung kann uns deshalb Auskunft über die während der Differenzierung ablaufenden Stoffwechselprozesse geben (für eine zusammenfassende Arbeit über die morphogenetische Bedeutung der Hämolympheproteine, siehe Chen, 1971).

Die Funktion der Hämolympheproteine scheint sehr komplex zu sein. Sie dienen als Vitellogene für die Eireifung (De Loof und De Wilde, 1970; Petzelt und Bier, 1970) und als Trägerstoffe für Hormone (Emmerich, 1970; Whitmor und Gilbert, 1972) und Metaboliten (Siakotos, 1960). Viele von ihnen zeigen aber auch Enzymaktivität (Laufer, 1960). Bei *Phormia regina* liegt bisher nur eine kurze Angabe von Chen und Levenbook (1966) vor, wonach gewisse Proteinfraktionen Malatdehydrogenase-Aktivität aufweisen. Wir haben deshalb eine eingehende Untersuchung über die in der Hämolymphe vorkommenden Enzyme durchgeführt. Wie unten noch beschrieben wird, konnten stadienspezifische Veränderungen sowohl im Isozymmuster als auch in der Aktivität der von uns untersuchten Enzyme festgestellt werden.

Material und Methoden

Als Versuchsmaterial dienten Larven, Puppen und frisch geschlüpfte Adultfliegen einer weissäugigen Mutante von *Phormia regina*. Die Larven wurden mit gehacktem Rindfleisch gefüttert, während die Adulttiere noch zusätzlich Zucker und Wasser erhielten. Bei 25°C und 60% Luftfeuchtigkeit dauert die Larvenentwicklung ca. 5½ Tage, und 6½ Tage nach der Verpuppung schlüpfen die Imagines aus dem Puparium.

[1] Ausgeführt und herausgegeben mit Unterstützung durch den Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung und die Georges u. Antoine Claraz-Schenkung.

Zur Gewinnung der Hämolymphe wurden die Larven des gewünschten Stadiums nach zweimaligem Waschen einzeln geöffnet, die Hämolymphe durch eine Mikropipette abgesaugt und in einem eisgekühlten Zentrifugengläschen gesammelt. Um die Hämocyten abzutrennen, wurden die Proben während 5 Min. bei 7000 U/min. und 0°C zentrifugiert. Da die Hämolymphe der Puppen mit den histolytischen Abbauprodukten stark vermischt ist, wurden jeweils 15 Tiere zusammen geöffnet und direkt zentrifugiert. Bei den Adulten wurd eein Flügel an der Basis abgeschnitten und durch leichtes Drücken auf das Abdomen ein Tropfen Körperflüssigkeit herausgepresst. Zur Hemmung der Tyrosinase wurden allen Probengläsern einige Kristalle Phenylthioharnstoff beigegeben.

Die Hämolympheproteine (200 μg) wurden zunächst mittels Polyacrylamidgel-Elektrophorese aufgetrennt (Davis, 1964) und die Isozymbanden histochemisch identifiziert. Es wurden die folgenden Substrate jeweils dem Inkubationsmedium zugegeben: α-Naphthylacetat für unspezifische Esterasen (Chippendale and Stanley, 1966), α-Naphthylphosphat für alkalische Phosphatase (Lawrence *et al.* 1960), und L-Leucin-β-naphthylamid für Leucinaminopeptidase (Knowles und Fristrom, 1967). Der Nachweis für Lactat-und Malatdehydrogenase erfolgte nach den Angaben von Chen (1968).

Es wurden die folgenden spektralphotometrischen Methoden für die Bestimmung der Enzymaktivität verwendet: unspezifische Esterasen nach Huggins und Lapides (1947), alkalische Phosphatase nach Bergmeyer (1970), Lactat- und Malatdehydrogenase nach Markert und Ursprung (1962), Leucinaminopeptidase nach Bernt und Bergmeyer (in Bergmeyer, 1962) und Proteasen nach Charney und Tomarelli (1947). Mit Ausnahme der Proteasen wurde die Aktivität, die pro Minute 1 μMol. Substrat umsetzte als 1 Enzymeinheit bezeichnet. Aus der Menge der jeweils gebrauchten Hämolymphe (5-50 μl) und ihrem Totalvolumen der einzelnen Entwicklungsstadien (Chen und Levenbook, 1966) konnten die Aktivitätseinheiten pro Larve, Puppe oder Adultfliege berechnet werden.

Ergebnisse und Diskussion

Für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Enzyme wurden insgesamt 2—8 Isozyme während der Postembryonalentwicklung gefunden (Abb. 1 und 2). Dass die beobachteten Banden nicht nur auf einer unspezifischen Bindung des Farbstoffes beruhen, zeigten die Kontrollversuche, in denen die Gele nach der Elektrophorese ohne Substrat inkubiert wurden und an den entsprechenden Gelregionen keine Farbreaktion auftrat. Das Muster der unspezifischen Esterasen (Est) und der alkalischen Phosphatase (AP) erweist sich als besonders differenziert (Abb. 1). Bei den Esterasen kommen 3 (Est_3, Est_5, Est_8) und bei der alkalischen Phosphatase 2 (AP_3, AP_7) Banden in allen Stadien vor, die als Hauptbanden bezeichnet werden können. Allgemein wurden die höchsten Enzymaktivitäten,

ersichtlich aus der Farbintensität und der Anzahl der gebildeten Isozymbanden, in den Puppenstadien festgestellt, was auf die morphogenetische Bedeutung dieser Enzyme in der Metamorphose hindeutet.

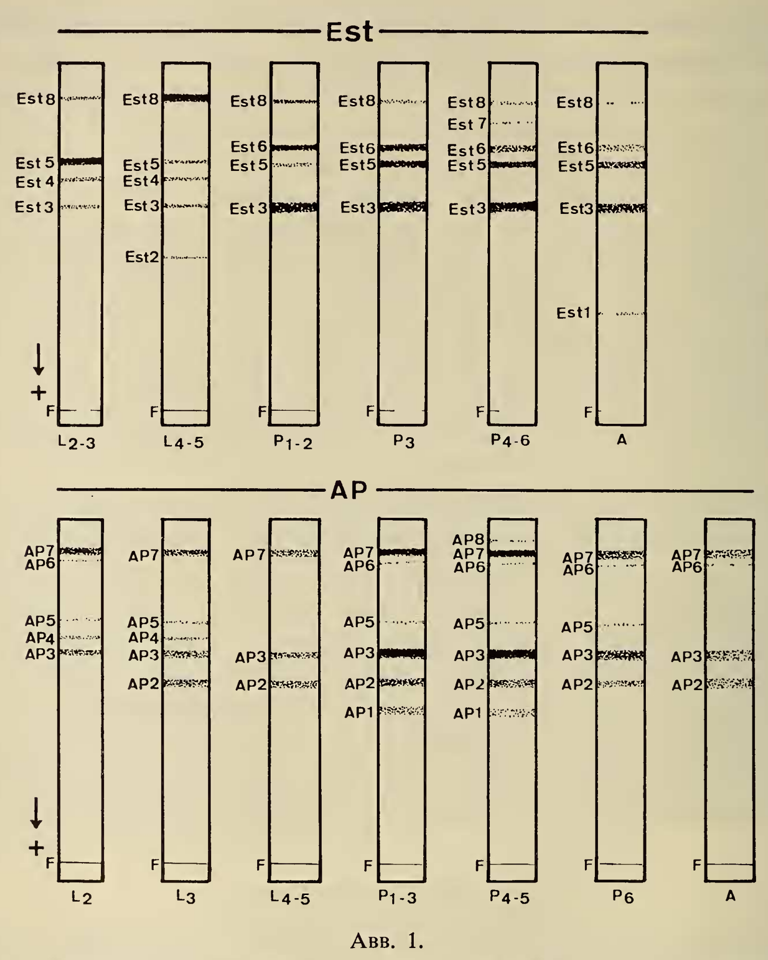


ABB. 1.

Zymogramme der unspezifischen Esterasen (Est) und alkalischen Phosphatase (AP) in der Hämolymphe von *Phormia regina.* Die einzelnen Banden sind nach ihrer anodischen Beweglichkeit nummeriert. L_{2}-$_{5}$ = 2– bis 5tägige Larven; $P_1 - 6$ = 1– bis 6tägige Puppen; A = frischgeschlüpfte Adultfliegen.

Bei den beiden Dehydrogenasen wurden nur wenige Isozymbanden gefunden (Abb. 2). Die Veränderungen des Enzymmusters bei der Lactatdehydrogenase finden vor allem in der Larvalentwicklung statt. Die auffälligste Isozymbande der Malatdehydrogenase ist MDH_3. Sie ist ausserordentlich stark angefärbt und charakteristisch für die Puppen und Adulttiere. Ihr Erscheinen mit Beginn der

Verpuppung lässt vermuten, dass dieses Enzym ebenfalls eine wichtige Rolle in der Metamorphose spielt.

Unter der vorliegenden Versuchsbedingung fanden wir lediglich 1—2 Isozyme der Leucinaminopeptidase in den Puppenstadien. Selbst bei Verwendung einer

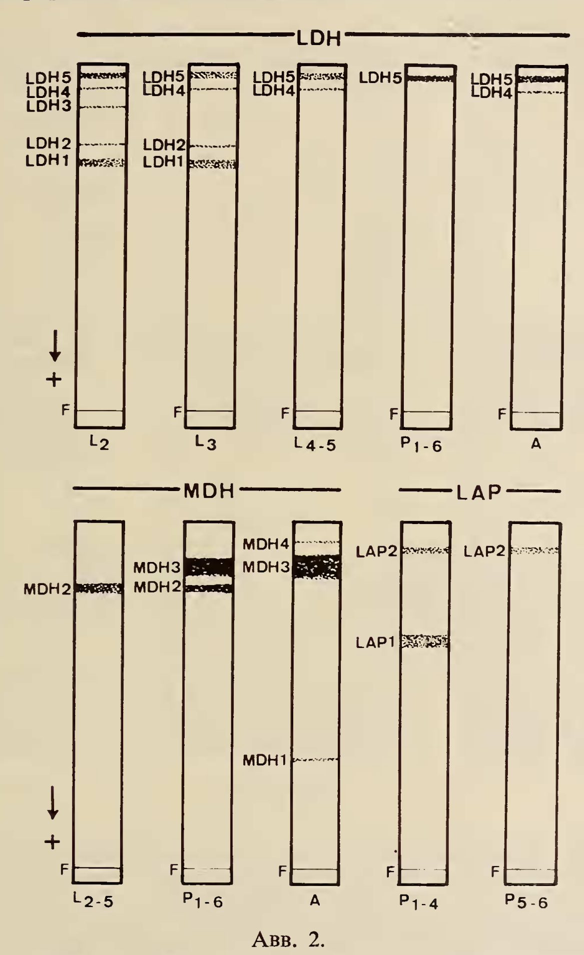


ABB. 2.

Zymogramme der Lactatdehydrogenase (LDH), Malatdehydrogenase (MDH) und Leucinaminopeptidase (LAP) in der Hämolymphe von *Phormia regina*. (für weitere Abklärung, siehe Abb. 1).

Proteinkonzentration von 500 μg konnte keine Aktivität dieses Enzyms in den Larven und Adultfliegen nachgewiesen werden. Bemerkenswert ist der Befund, dass die Isozymbande LAP_1 in den 1—4 tägigen Puppen sehr konzentriert vorkommt und dann vollständig verschwindet (siehe Abb. 2).

Die Ergebnisse der spektralphotometrischen Bestimmung der Enzymaktivitäten sind in Abbildung 3 zusammengefasst. Im allgemeinen zeigten die unter-

suchten Enzyme ein ähnliches Verhalten: Ihre Aktivität steigt im Laufe des Larvalwachstums eindeutig an und erreicht ein Maximum kurz vor der Verpuppung. Sie nimmt mit Beginn der Puppenruhe rasch ab, bleibt auf einem ziemlich tiefen Niveau in der Mitte der Puppenentwicklung, und steigt nachher

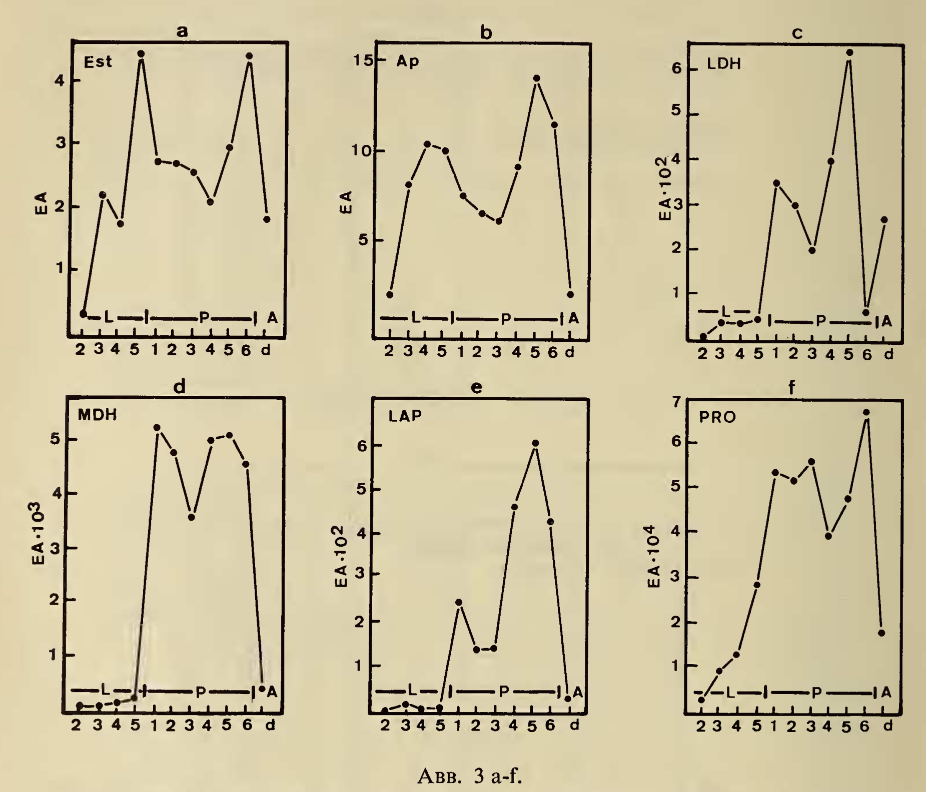


Abb. 3 a-f.

Ontogenetische Veränderungen der Aktivitäten von unspezifischen Esterasen (Est), alkalischer Phosphatase (AP), Lactatdehydrogenase (LDH), Malatdehydrogenase (MDH), Leucinaminopeptidase (LAP) und Proteasen (PRO) in der Hämolymphe. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert aus 12 Messungen. Ordinate: Enzymaktivität (EA) = μ Mol verbrauchtes Substrat/ Min./gesamte Hämolymphe. Abszisse. Entwicklungsalter in Tagen (d) nach Schlüpfen aus dem Ei, bzw. nach Beginn der Verpuppung, bei 25°C. L = Larven, P = Puppen, A = frischgeschlüpfte Adulttiere.

wieder an, bis zu einem zweiten Maximum unmittelbar vor dem Schlüpfen. Mit anderen Worten entspricht das Aktivitätsmuster weitgehend einer für die holometabolen Insekten typischen U-förmigen Kurve.

Ein abweichendes Verhalten zeigen die beiden Enzyme Malatdehydrogenase und Leucinoaminopeptidase (Abb. 3*d*, *e*). Ihre Aktivität bleibt während der ganzen Larvenentwicklung äusserst gering, steigt aber kurz vor der Verpuppung sprunghaft an. Obwohl eine deutliche Abnahme in den 3-tägigen Puppen fest-

zustellen ist, bleibt die Aktivität immer noch wesentlich über derjenigen sämtlicher Larvenstadien.

Überall liegt die Enzymaktivität der frisch geschlüpften Imagines viel tiefer als diejenige der Puppen vor dem Schlüpfen. Die einzige Ausnahme bildet die Lactatdehydrogenase (Abb. 3*c*). Im Vergleich zum letzten Puppenstadium nimmt die Aktivität dieses Enzyms bei den adulten Tieren um mehr als das 4-fache zu.

Aufgrund der Messwerte der untersuchten Enzyme konnte kein gesicherter Unterschied zwischen frisch geschlüpften Männchen und Weibchen festgestellt werden. Für die einzelnen Entwicklungsstadien ergaben unsere Befunde eine gute Übereinstimmung zwischen der Farbintensität des Isozymmusters und der Totalaktivität der betreffenden Enzyme. Aus einer eingehenden Analyse der elektrophoretischen Beweglichkeit der Protein- und Isozymbanden (Daten hier nicht gezeigt) muss angenommen werden, dass viele Hämolympheproteine tatsächlich als Enzyme wirken. Angesichts der zahlreichen Befunde bei anderen Insekten, deren Genetik bekannt ist, können die in der vorliegenden Untersuchung festgestellten stadien-spezifischen Veränderungen dieser Enzyme als Folge der während der Ontogenese stattfindenden differenziellen Genaktivierung erklärt werden (siehe, Chen, 1971).

Summary

By means of electrophoretic and spectrophotometric methods the isozyme patterns and activity of 6 enzymes (non-specific esterases, alkaline phosphatase lactate dehydrogenase, malate dehydrogenase, leucine aminopeptidase and proteases) in the haemolymph of *Phormia regina* have been studied. There are distinct stage-specific changes in the intensity and number of the isozyme bands as well as in the total activity of each enzyme. Such changes can be explained on the basis of differential gene activation which takes place during insect development.

LITERATUR

Bergmeyer, H. U. 1970. Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie.

Charney, J. and R. M. Tomarelli. 1947. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. *J. biol. Chem.* 171: 501-505.

Chen, P. S. 1968. Patterns of soluble proteins and multiple forms of dehydrogenases in amphibian development. *J. exp. Zool.* 168: 337-350.

Chen, P. S. 1971. Biochemical Aspects of Insect Development. *Karger*, Basel.

Chen, P. S. and L. Levenbook. 1966. Studies on the haemolymph proteins of the blowfly *Phormia regina* L. I. Changes in ontogenetic patterns. *J. Insect Physiol.* 12: 1595-1609.

Chippendale, G. M. and D. B. Stanley. 1966. Haemolymph proteins of *Ostrinia nubialis* during diapause and prepupal differentiation. *J. Insect Physiol.* 12: 1629-1638.

Davis, J. B. 1964. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121: 404-427.

Emmerich, H. 1970. Über die Hämolympheproteine von *Pyrrhocoris apterus* und über die Bindung von Ecolyson durch Hämolympheproteine. *J. Insect Physiol.* 16: 725-747.

Huggins, C. and J. Lapides. 1947. Chromogenic substrates. IV. Acyl esters of p-nitrophenol as substrate for the colorimetric determination of esterases. *J. biol. Chem.* 170: 467-482.

Knowles, B. B. and J. W. Fristrom. 1967. The electrophoretic behaviour of ten enzyme systems in the larval integument of *Drosophila melanogaster. J. Insect Physiol.* 13: 731-737.

Laufer, H. 1960. Blood Proteins in insect development. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 89: 490-515.

Lawrence, S. H., P. J. Melnick and H. E. Weimer. 1960. A species comparison of serum proteins and enzymes by starch gel electrophoresis. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 105: 572-575.

Loof, A. de and J. de Wilde. 1970. The relation between haemolymph proteins and vitellogenesis in the Colorado beetle, *Leptinotarsa decemlineata. J. Insect Physiol.* 16: 157-169.

Markert, C. L. and H. Ursprung. 1962. The ontogeny of isozyme patterns of lactate dehydrogenase in the mouse. *Develop. Biol.* 5: 363-381.

Petzelt, C. and K. Bier. 1970. Synthese der Hämolymphproteine und die Aufnahme der Dotterfraktion in die Oocyte unter Actinomycin-Einfluss. (Untersuchungen an *Musca domestica*). *Roux'Arch.* 164: 359-366.

Siakotos, A. N. 1960. The conjugated plasma proteins of the American cockroach. II. Changes during the molting and clotting process. *J. gen. Physiol.* 43: 1015-1030.

Whitmore, E. and L. I. Gilbert. 1972. Haemolymph lipoprotein transport of juvenile hormone. *J. Insect Physiol.* 18: 1153-1167.